

# **Relazione sull'attività svolta e sui primi risultati ottenuti nell'ambito del progetto Apenet per la tematica “Effetti del mais conciato sulle api”**

Relazione aggiornata al 4 Settembre 2009 con inserimento dei dati delle analisi e delle elaborazioni statistiche pervenute al CRA-API dalla data di presentazione della precedente versione (30 Giugno 2009).

1. La rete di monitoraggio	<b>Pag. 3</b>
1.1 Il sistema delle segnalazioni	Pag. 4
1.2 La Squadra di Pronto Intervento	Pag. 5
2. Dispersione di polveri durante la semina del mais conciato e stima degli effetti sulle api	<b>Pag. 6</b>
2.1 Test di polverosità del seme	Pag. 6
2.2 Dispersione delle polveri durante la semina	Pag. 7
2.3 Valutazione degli effetti sulle api delle polveri rilasciate durante la semina	Pag. 11
2.4 Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais e studio della persistenza nel suolo e della traslocazione nella pianta dei principi attivi usati per la concia	Pag. 14
3. Effetti della guttazione del mais sulle api	<b>Pag. 16</b>
3.1 Residui di principio attivo nelle gocce di guttazione di plantule di mais cresciute in vaso	Pag. 16
3.2 Residui di clothianidin nelle gocce di guttazione di plantule di mais cresciute in campo e verifica dell'attività di bottinamento delle api	Pag. 16
4. Effetti letali e subletali sulle api in laboratorio dei principi attivi usati nella concia delle sementi	<b>Pag. 18</b>
4.1 Effetti subletali: PER test per saggiare la capacità di apprendere e riconoscere gli odori	Pag. 18
4.2 Effetti subletali: Test del labirinto per verificare l'impatto sull'orientamento	Pag. 22
4.3 Effetti letali	Pag. 22
4.4 Effetti sulla covata	Pag. 23
5. Conclusioni	<b>Pag. 24</b>
Responsabili delle ricerche descritte nei singoli capitoli	<b>Pag. 26</b>

Con riferimento al D.M. 19735/7303/08 del 29 dicembre 2008, che concede al CRA un contributo per lo svolgimento del progetto di ricerca “APENET monitoraggio e ricerca in apicoltura”, e alla richiesta, espressa nella lettera prot. 611 del 12 gennaio 2009 di trasmissione del decreto stesso, di dare priorità alle sperimentazioni sugli effetti del mais conciato sulle api, si riportano i primi risultati ottenuti nell’ambito delle linee di ricerca riguardanti la tematica sopracitata.

## 1. La rete di monitoraggio

Nell’ambito del Progetto Apenet è prevista la messa a punto di una rete di monitoraggio nazionale, costituita da moduli, a loro volta formati da 5 stazioni di 10 alveari ciascuno, disposti nelle diverse realtà territoriali di ogni Regione. La funzione della rete di monitoraggio è raccogliere informazioni sullo stato di salute delle famiglie di api che compongono i moduli, attraverso vari rilevamenti e periodiche analisi di laboratorio su diverse matrici (api morte, api vive, covata, miele, cera, polline).

Oltre alle analisi di routine, in caso di eventi anomali di mortalità è previsto che vengano effettuate visite supplementari (controlli fuori periodo) con relativa raccolta di campioni (analisi straordinarie). In questo primo semestre di attività è stata attivata la rete nazionale di monitoraggio costituita da almeno un modulo per ciascuna Regione e Provincia Autonoma (Figura 1). Nell’attività della rete nazionale sono state coinvolte anche altre iniziative di monitoraggio nazionali o locali già attive o in fase di attivazione, tra cui la rete di monitoraggio delle aree naturali protette finanziata dal Ministero dell’Ambiente e gestita dall’ISPRA, attualmente in fase di attivazione in 4 aree (Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Lazio), e le reti di monitoraggio regionali già attive di Lombardia, Toscana, Friuli Venezia Giulia e Piemonte. A queste si potrebbe aggiungere la Regione Umbria per l’attivazione di un secondo modulo, e la Regione Basilicata per il cofinanziamento dei moduli.

Ad oggi sono stati realizzati i primi due dei quattro sopralluoghi previsti e il terzo è attualmente in corso; le analisi di routine dei campioni raccolti nel corso delle visite sono in corso.



**Figura 1** - Localizzazione delle stazioni di monitoraggio della rete nazionale Apenet (in colore rosso). Sono anche incluse (in colore fucsia) le stazioni delle reti di monitoraggio regionali di Lombardia, Friuli Venezia Giulia e Piemonte.

Nel primo semestre di attività (marzo - agosto 2009) della rete di monitoraggio, non sono stati segnalati eventi straordinari di morie o spopolamenti, né in corrispondenza dei controlli programmati di marzo-aprile, né in quelli fino ad ora effettuati in giugno, in occasione del secondo turno di rilievi, né nel periodo fra il primo controllo ed il successivo. Fa eccezione la postazione CLB 2 di Rossano Calabro, limitrofa all'area agrumicola della Piana di Sibari, dove si è verificata un'ampia moria di api dovuta all'utilizzo di neonicotinoidi durante la fioritura degli agrumi (controlli eseguiti tardivamente nel mese di maggio).

Sono state inoltre effettuate visite di sopralluogo ai moduli regionali in Sicilia, Sardegna e Campania. Sono già state programmate a breve analoghe visite in Marche, Puglia, Calabria e Basilicata.

La rete di monitoraggio e il database per la gestione di dati di campo sono gestiti dal Centro di riferimento per l'Apicoltura dell'IZS delle Venezie, con la collaborazione del DiSTA dell'Università di Bologna.

### 1.1 Il sistema delle segnalazioni

Un importante strumento a supporto del monitoraggio è quello costituito dalle segnalazioni, che permettono di rilevare eventi anomali in alveari che non fanno parte della rete. Il sistema delle segnalazioni prevede che l'apicoltore riporti al Servizio Veterinario dell'ASL competente per territorio o ai centri di raccolta deputati (tra cui il CRA-API, il DiSTA dell'Università di Bologna e l'Università di Udine) l'episodio di mortalità e che lo stesso proceda al necessario sopralluogo, alla raccolta di campioni, alla loro adeguata conservazione (-20°C) e all'invio al laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale per le analisi del caso.

Negli anni passati, e in particolare nella primavera del 2008, le segnalazioni di mortalità o spopolamento degli alveari da parte degli apicoltori sono stati di fondamentale importanza per l'individuazione e la quantificazione delle morie causate dalla semina di mais conciato.

Il raffronto tra le segnalazioni pervenute ai Servizi Veterinari e ai centri di raccolta nella primavera 2008 e nella primavera di quest'anno nelle aree maidicole è riassunto nella Tabella 1.

Regione	N. di segnalazioni in aree maidicole		Altre segnalazioni durante la primavera 2009
	Primavera 2008	Primavera 2009	
Lombardia	40	1	
Piemonte	8		2
Emilia-Romagna	7	1 + 1*	
Veneto e Trentino	20		3
Friuli Venezia Giulia	110		1
Calabria			1
<b>TOTALE</b>	<b>185</b>	<b>2 + 1*</b>	<b>7</b>

**Tabella 1** – Numero di segnalazioni pervenute ai servizi veterinari e ai centri di raccolta nelle primavere 2008 e 2009 in aree maidicole e non (Fonte IZS delle Venezie).

\* segnalazione non ufficiale

Nella primavera 2008 tutte le 185 segnalazioni sono avvenute in concomitanza con la semina del mais; 132 campioni sono stati raccolti e analizzati, di cui il 57,5% è risultato positivo ai neonicotinoidi usati per la concia delle sementi di mais.

Nel 2009 due sole segnalazioni ufficiali sono pervenute al Servizio Veterinario durante il periodo della semina del mais, più una non ufficiale pervenuta direttamente al CRA-API, tutte e tre risultate connesse all'utilizzo non autorizzato di sementi di mais conciato. Il caso della Lombardia riguarda un apicoltore della provincia di Varese che ha segnalato una mortalità anomala il giorno 5 maggio, successivamente alla semina di mais negli appezzamenti vicini all'apiario. L'analisi delle api morte non ha rivelato presenza di residui, mentre dall'analisi delle piantine di mais è risultata la presenza di 6000 ppb di clothianidin. Gli altri due casi verranno descritti nel paragrafo seguente.

Nel corso della primavera altri 7 campioni collegati a segnalazioni sono pervenuti ai servizi veterinari. Di questi, 5 sono risultati positivi ai neonicotinoidi, ma l'evento è risultato essere causato dall'utilizzo non corretto di prodotti spray a base di neonicotinoidi nei frutteti. Per gli altri 2 le analisi non hanno rilevato presenza di residui.

### **1.2 La Squadra di Pronto Intervento**

In collegamento con il sistema delle segnalazioni è stata istituita la Squadra di Pronto Intervento (SPI), che interviene direttamente sul luogo ove l'apicoltore ha segnalato il danno alle api, raccogliendo informazioni e campioni per le analisi. Tale intervento viene effettuato nei casi in cui l'evento segnalato, sulla base del colloquio con l'apicoltore, risulti di origine sconosciuta; quest'anno sono stati tenuti in particolare considerazione i casi verificatisi in concomitanza con le semine del mais. La squadra è formata da un esperto del CRA-API o del DiSTA Università di Bologna e un tecnico apistico competente di patologie, più eventuali altre figure di supporto. Tra gli interventi effettuati in questo avvio di anno, si riportano i due relativi alle morie durante la semina del mais.

Nel primo caso il sopralluogo è stato effettuato il 22 marzo 2009 ad Ozzano Emilia (BO) dove, pochi giorni dopo la semina, un apiario di 39 alveari, situato al limite di un campo di mais è stato trovato fortemente danneggiato. La popolazione di api negli alveari risultava ridotta di circa il 50%, molte api erano presumibilmente morte in campo, altre sono state trovate morte di fronte all'alveare. Gli alveari avevano attività di volo scarsa o nulla e le api vive mostravano spasmi nervosi, mancanza di energia, stordimento, disorientamento, movimenti tremolanti e molto lenti, tutti sintomi compatibili con quelli da intossicazione da neonicotinoidi riportati in letteratura. Tali sintomi erano ancora evidenti in un successivo sopralluogo, effettuato dopo 6 giorni nella nuova postazione in cui l'intero apiario era stato prontamente spostato.

L'analisi dei semi e delle piantine di mais raccolti in campo, effettuata presso l'IZS delle Venezie, ha rilevato la presenza di residui di 3 diversi neonicotinoidi, a diverse concentrazioni (nei semi: imidacloprid 30 ng/g, thiamethoxam 320 ng/g, clothianidin 60 ng/g; nelle piantine: clothianidin 2.900 ng/g). L'analisi della flora spontanea circostante il campo, effettuata presso il CRA-API, ha rilevato la presenza su fiori di *Veronica* sp. di residui di imidacloprid (470 ng/g) e di thiamethoxam (1.060 ng/g). I risultati delle analisi indicano pertanto che il danno agli alveari è stato causato dall'utilizzo non autorizzato di neonicotinoidi per la concia delle sementi di mais (probabilmente lotti misti di semi conciatati con diversi principi attivi, avanzati dalla scorsa stagione).

La segnalazione non ufficiale è giunta invece da un apicoltore della provincia di Reggio Emilia per un apiario stanziale di 20 alveari situato in vicinanza di un campo di mais (a 800 metri di distanza). Negli alveari è stata osservata elevata mortalità e scarsa attività di volo, oltre a comportamenti anomali delle api adulte, come aggressività e spasmi nervosi. L'analisi delle api morte, effettuata presso il CRA-API di Bologna, ha rilevato 54 ng/g di clothianidin, suggerendo l'utilizzo illegale di semente conciatata con questo neonicotinoide.

## 2. Dispersione di polveri durante la semina del mais conciato e stima degli effetti sulle api

La linea di ricerca prevede:

- la misura della polverosità del seme di mais conciato con i 4 principi attivi oggetto dell'indagine;
- la quantificazione delle polveri e del principio attivo emessi a terra e nell'aria durante la semina con seminatrice pneumatica modificata e non;
- la valutazione degli effetti sulle api delle polveri rilasciate durante la semina;
- la valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia del mais;
- la valutazione della persistenza nel suolo e della traslocazione dei principi attivi in diverse parti della pianta.

In seguito all'incontro avvenuto in data 9 febbraio 2009 tra i ricercatori del progetto Apenet e i rappresentanti di Agrofarma-Federchimica, UNACOMA, UNIMA, ENAMA, CONFAI, Ditte sementiere, è stato deciso che:

- a) le sementi conciate dovessero rispettare una polverosità non superiore a 3 g/100 kg, misurata con il metodo Heubach (metodo ESA 09.125.1);
- b) le prove con la seminatrice dovessero utilizzare il modello di seminatrice pneumatica più diffuso, successivamente individuato da UNACOMA e UNIMA in un modello Matermacc a sei file;
- c) la macchina fosse dotata del sistema di riduzione della polverosità "dual pipe deflector", eseguendo il confronto tra seminatrice con e senza modifica.

Tali decisioni sono quindi state illustrate e ratificate nella successiva riunione convocata dal MIPAAF nella stessa data, alla presenza dei rappresentanti dei Ministeri e delle Associazioni di categoria.

Si precisa, riguardo la macchina seminatrice consegnata da MaterMacc Srl a CRA-ING in data 2 marzo 2009, che il modello prescelto era impostato per seminare con interfila di 45 cm e non era modificabile.

### 2.1 Test di polverosità del seme

I risultati del test di polverosità del seme con il cilindro di Heubach sono riportati nella Tabella 2, dove vengono anche confrontati con i risultati del test eseguito dal produttore entro le 48 ore dalla concia.

Le quantità di polvere fine, quella cioè che rimane intrappolata nel filtro dell'Heubach e sulla quale viene fatta la valutazione, è risultata più alta di quella dichiarata dal produttore, ma comunque al di sotto del limite stabilito di 3 g/q.

Oltre alle polveri fini, è da segnalare anche il rilascio dal seme di elevate quantità di polveri grosse, che non vengono intercettate dal filtro dello strumento, e costituiscono circa il 90% della polvere totale estratta.

Concia	Polverosità dichiarata dal produttore (g/q)	Polverosità rilevata dal CRA-ING (g/q)		
		Polvere fine	Polvere grossa	Polvere totale
Gaicho (imidacloprid)	0,9600	1,6664	14,9975	16,6639
Poncho (clothianidin)	1,7700	2,1668	33,3358	35,5026
Cruiser (thiamethoxam)	1,3300	2,4999	16,6658	19,1657
Regent (fipronil)	1,1100	1,6663	18,3291	19,9953

**Tabella 2** – Polverosità del seme conciato con i 4 p.a., misurata con il cilindro di Heubach.

## 2.2 Dispersione delle polveri durante la semina

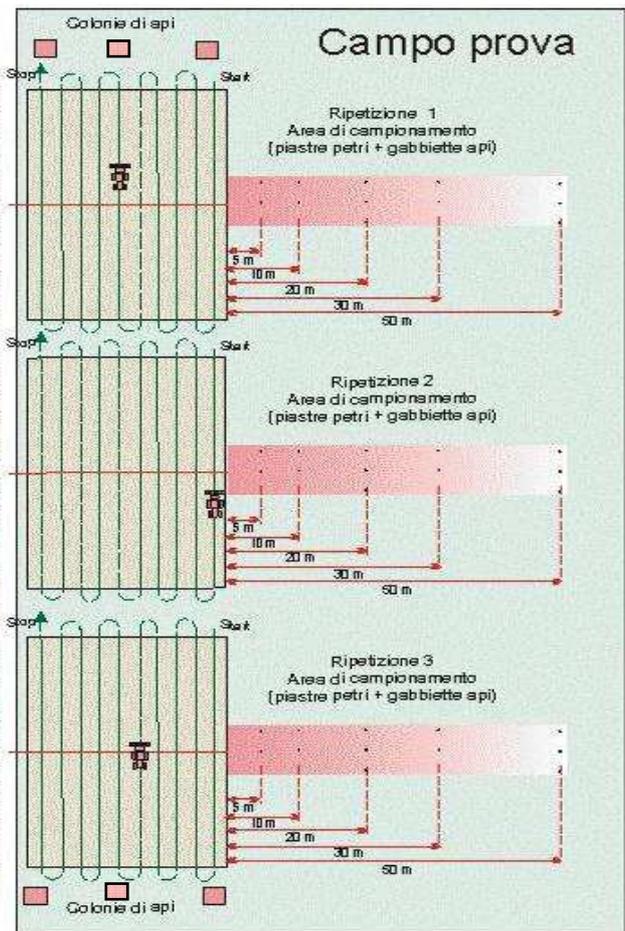
Le prove di campo effettuate dal CRA-ING presso i campi sperimentali di Monterotondo e Tormancina, prevedevano la semina sequenziale di parcelle sperimentali di mais conciato con i 4 principi attivi e la macchina seminatrice modificata o non modificata.

L'inizio delle prove era previsto per la metà di marzo 2009, essendo l'epoca indicata per la semina del mais in molte Regioni italiane, ma l'elevata piovosità della stagione ha consentito un primo accesso ai campi a metà aprile e successivamente solo a partire da inizio maggio. Le prove di campo sono state comunque concluse per tutti e 4 i principi attivi con la seminatrice modificata e per imidacloprid, clothianidin e thiamethoxam con quella non modificata.

Ciascun appezzamento destinato alla prova con un p.a. è stato suddiviso in tre parcelle (ripetizioni), che sono state seminate nel corso della stessa giornata. Il campionamento delle polveri disperse sul terreno è stato effettuato tramite una serie di piastre Petri, riempite con una soluzione di acetonitrile/acqua al 50%, che fissa il p.a. presente nella polvere, poste in ciascuna parcella a distanze crescenti (5, 10, 20, 30, 50 m) dalla zona di semina, secondo lo schema mostrato in Figura 2. E' stata quindi calcolata la concentrazione media di p.a. per unità di superficie nelle piastre Petri.

Per ognuna delle 3 ripetizioni e ad ogni distanza sono state poste 3 piastre Petri; pertanto il dato finale di rilascio di polveri deriva dalla media di 9 valori per ciascuna delle distanze.

Per ogni prova sono stati inoltre misurati i seguenti parametri ambientali: temperatura, umidità relativa, velocità del vento e radiazione solare media oraria. Le condizioni ambientali nelle giornate delle semine con i diversi principi attivi sono riportate nella Tabella 3.



**Figura 2** – Disegno sperimentale delle prove di deriva in campo. Per la semina con ciascun p.a., un appezzamento è stato suddiviso in tre parcelle. Per ogni parcella sono state posizionate, a distanza crescente dalla zona di semina (5, 10, 20, 30, 50 metri), una serie di 3 piastre Petri per la captazione delle polveri.

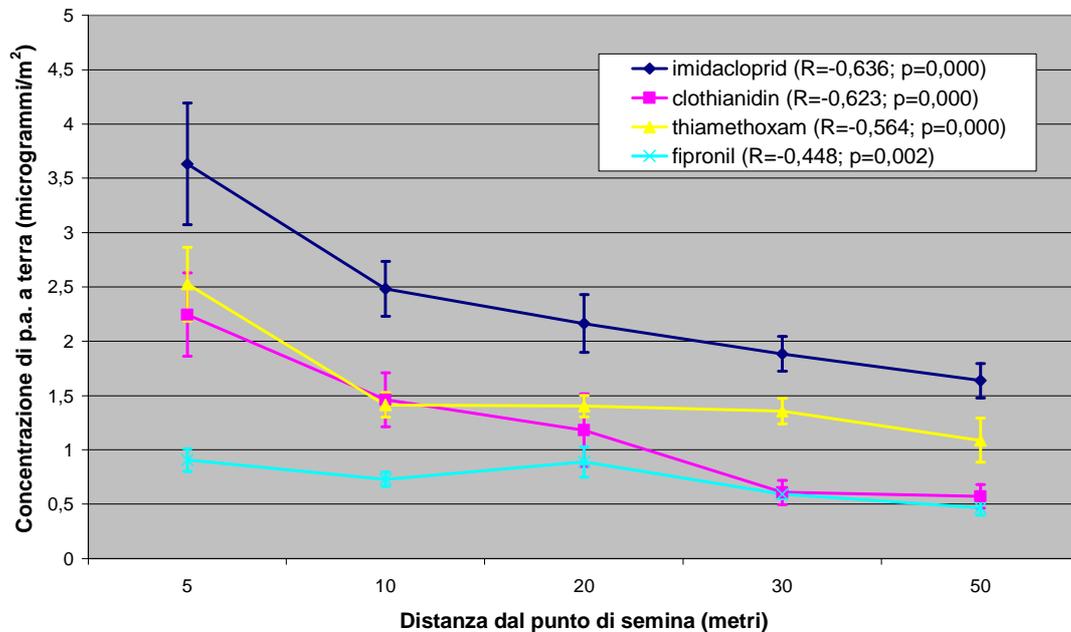
Ai bordi dell'appezzamento sono stati posizionate sei alveari, tre per ciascun lato.

Principio attivo	Deflettore (si/no)	Data semina	T (°C)	U.R. (%)	Velocità vento (m/sec)	Radiazione solare media oraria (KJ/m <sup>2</sup> )
imidacloprid	si	16/04/09	18,74	47,20	3,07	-
clothianidin		04/05/09	15,80	75,20	0,93	2918,50
thiamethoxam		12/05/09	25,36	40,00	1,28	3407,00
Fipronil		20/05/09	29,54	36,80	1,60	3606,80
imidacloprid	no	04/06/09	26,74	73,00	3,90	3277,80
clothianidin		11/06/09	27,40	33,00	2,52	3640,40
thiamethoxam		18/06/09	30,90	39,40	1,80	3696,00
fipronil		-	-	-	-	-

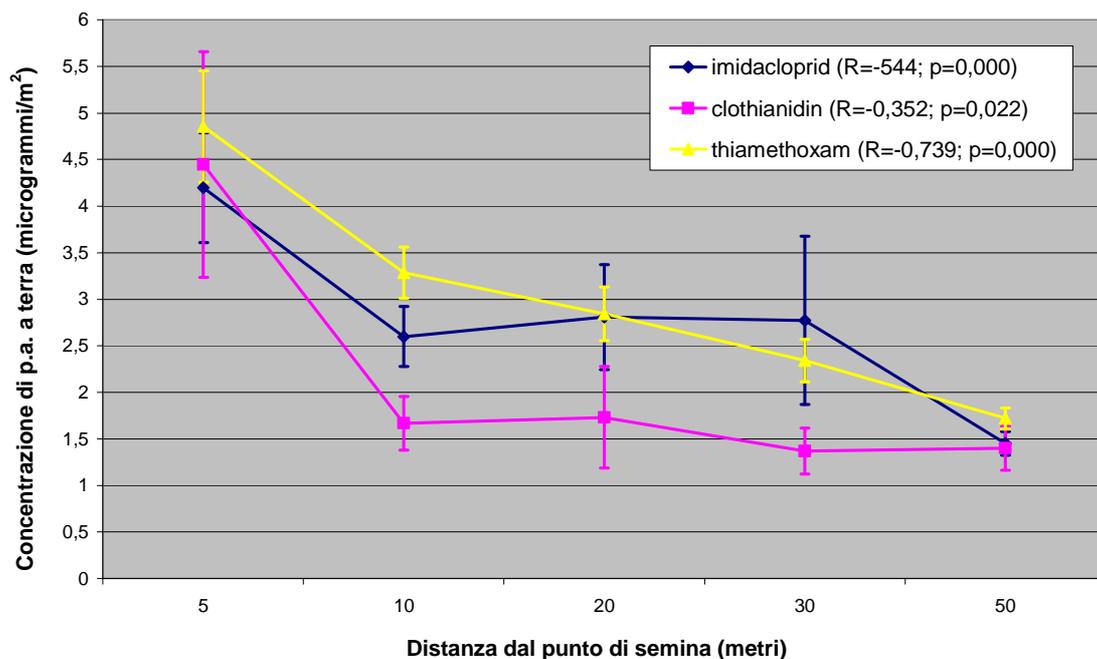
**Tabella 3** – Dati ambientali medi rilevati durante le giornate di semina con i 4 p.a. (fonte UCEA).

Le analisi dei residui, effettuate dal CRA-PAV di Roma, sono state eseguite in cromatografia liquida a rivelazione di massa triplo quadrupolo (tandem HPLC-MS-MS), con strumentazione Waters 4micro, interfaccia ESI POS e ESI NEG in modalità MRM. Tutti i metodi sono stati validati secondo procedure GLP standard.

I risultati delle analisi delle piastre Petri sono completi per tutti i principi attivi per le prove con la seminatrice modificata. Con la seminatrice non modificata mancano i dati relativi al fipronil. I risultati della dispersione dei principi attivi a terra sono riassunti nelle Figure 3a e 3b.



**Figura 3a** - Dispersione dei quattro p.a. a terra durante la semina con seminatrice modificata. Ogni punto del grafico rappresenta media  $\pm$  errore standard per n=9. Le differenze tra le distanze sono statisticamente significative per tutti i p.a. (test per ranghi di Spearman).



**Figura 3a** - Dispersione dei quattro p.a. a terra durante la semina con seminatrice non modificata. Ogni punto del grafico rappresenta media  $\pm$  errore standard per n=9. Le differenze tra le distanze sono statisticamente significative per tutti i p.a. (test per ranghi di Spearman).

In tutte le prove, sia con la seminatrice modificata sia con quella non modificata, si rileva una riduzione della concentrazione del principio attivo a terra all'aumentare della distanza dal bordo della parcella seminata. Tale riduzione è risultata statisticamente significativa per tutti i principi attivi (test di correlazione per ranghi di Spearman).

I valori rilevati e le percentuali di abbattimento ottenute con l'uso del deflettore sono riportati, per 3 dei 4 principi attivi, nelle Tabelle 4a, 4b e 4c. L'applicazione della modifica "dual pipe deflector" alla seminatrice ha portato a percentuali di abbattimento molto variabili, in funzione del p.a.

Distanza dal punto di semina (metri)	Concentrazione <b>imidacloprid</b> a terra ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento	p (test U di Mann-Whitney)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata		
5	4,20 $\pm$ 0,59	3,63 $\pm$ 0,56	13%	0,344563
10	2,60 $\pm$ 0,32	2,48 $\pm$ 0,25	4%	0,964784
20	2,81 $\pm$ 0,56	2,16 $\pm$ 0,27	23%	0,630428
30	2,77 $\pm$ 0,90	1,89 $\pm$ 0,16	32%	0,791082
50	1,45 $\pm$ 0,13	1,64 $\pm$ 0,16	-13%	0,452913

**Tabella 4a** - Confronto nella concentrazione del p.a. imidacloprid a terra tra seminatrice modificata e non modificata (media  $\pm$  errore standard, n=9). Le differenze tra le due tesi non sono statisticamente significative per nessuna delle distanze (test U di Mann-Whitney).

Distanza dal punto di semina (metri)	Concentrazione <b>clothianidin</b> a terra ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento	p (test U di Mann-Whitney)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata		
5	4,45 $\pm$ 1,21	2,25 $\pm$ 0,38	49%	0,665
10	1,67 $\pm$ 0,29	1,46 $\pm$ 0,25	12%	0,791
20	1,73 $\pm$ 0,54	1,18 $\pm$ 0,33	32%	0,402
30	1,37 $\pm$ 0,25	0,61 $\pm$ 0,11	56%	<b>0,018</b>
50	1,40 $\pm$ 0,24	0,57 $\pm$ 0,11	59%	<b>0,005</b>

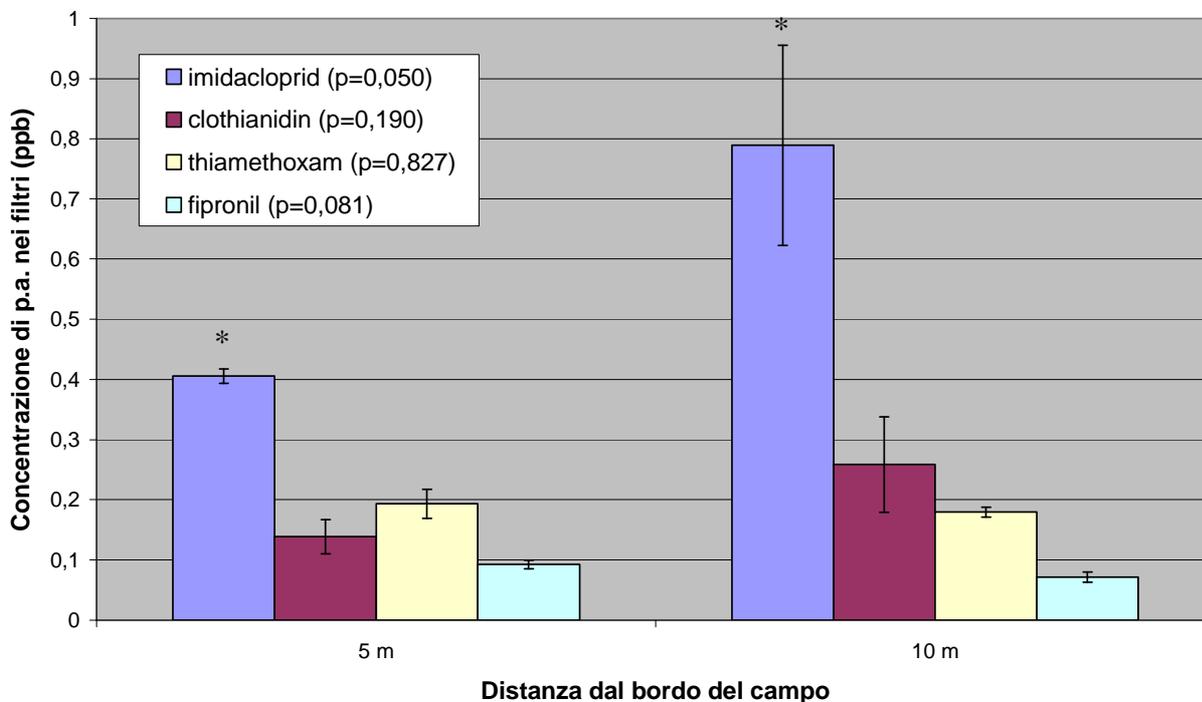
**Tabella 4b** - Confronto nella concentrazione del p.a. clothianidin a terra tra seminatrice modificata e non modificata (media  $\pm$  errore standard, n=9). Le differenze tra le due tesi sono statisticamente significative per le distanze di 30 e 50 metri (test U di Mann-Whitney).

Distanza dal punto di semina (metri)	Concentrazione <b>thiamethoxam</b> a terra ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento	p (test U di Mann-Whitney)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata		
5	4,85 $\pm$ 0,60	2,53 $\pm$ 0,34	48%	<b>0,005</b>
10	3,29 $\pm$ 0,28	1,42 $\pm$ 0,11	57%	<b>0,000</b>
20	2,84 $\pm$ 0,29	1,40 $\pm$ 0,10	51%	<b>0,000</b>
30	2,34 $\pm$ 0,23	1,36 $\pm$ 0,12	42%	<b>0,004</b>
50	1,72 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,20	37%	<b>0,017</b>

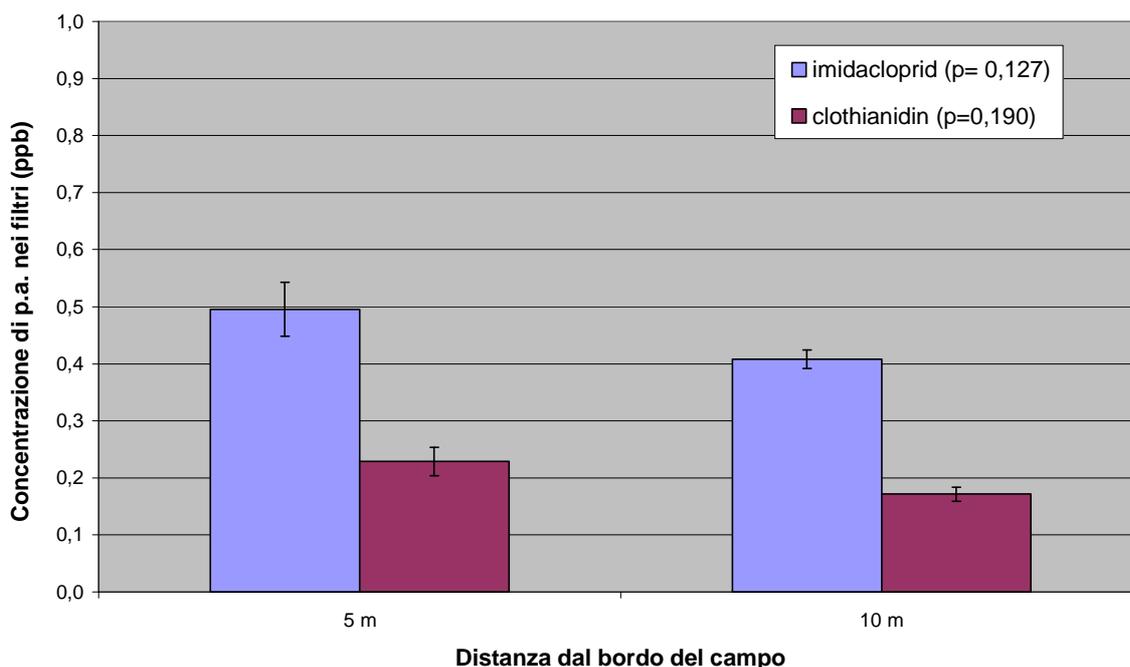
**Tabella 4c** - Confronto nella concentrazione del p.a. thiamethoxam a terra tra seminatrice modificata e non modificata (media  $\pm$  errore standard, n=9). Le differenze tra le due tesi sono statisticamente significative per tutte le distanze (test U di Mann-Whitney).

E' stato anche misurato il rilascio di polveri nell'aria, mediante campionatori costituiti da pompe aspiratrici con filtro in fluoropore da 45 mm, posizionati alla distanza di 5 e 10 m e all'altezza di 170 cm dal suolo, che hanno campionato 100 L di aria ciascuno. E' stata quindi calcolata la

concentrazione dei quattro principi attivi nella semina con seminatrice modificata. I risultati sono mostrati nelle Figure 4a e 4b. Le differenze nella concentrazione delle polveri captate dai campionatori alle due distanze risultano statisticamente significative solo per imidacloprid nella semina con seminatrice modificata (test U di Mann-Whitney, valori di p in figura).



**Figura 4a** – Concentrazione dei 4 p.a. nell’aria, rilevata con i campionatori a 5 e 10 metri dalla parcella seminata con la seminatrice modificata. Ogni barra rappresenta media  $\pm$  errore standard, per n=3. Le barre contrassegnate dall’asterisco indicano differenze statisticamente significative tra le 2 distanze (test U di Mann-Whitney).



**Figura 4b** – Concentrazione di due dei 4 p.a. nell'aria, rilevata con i campionatori a 5 e 10 metri dalla parcella seminata con la seminatrice non modificata. Ogni barra rappresenta media  $\pm$  errore standard, per n=3. La differenza nelle concentrazioni tra le 2 distanze non risulta statisticamente significativa (test U di Mann-Whitney).

Il confronto nel rilascio di polveri nell'aria tra la semina con seminatrice modificata e non modificata per imidacloprid e clothianidin è riportato nelle Tabelle 5a e 5b. Le differenze nella concentrazione delle polveri emesse dalla seminatrice modificata e non modificata sono al limite del livello di significatività per  $p < 0,05$  per entrambe le distanze (test U di Mann-Whitney, valori di p in tabella).

Distanza dal punto di semina (metri)	Concentrazione <b>imidacloprid</b> nell'aria (ppb) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento	p (test U di Mann-Whitney)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata		
5	0,50 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,01	18,13%	<b>0,050</b>
10	0,41 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,17	-93,31%	<b>0,050</b>

**Tabella 5a** - Confronto nella concentrazione di imidacloprid nell'aria tra seminatrice modificata e non modificata (media  $\pm$  errore standard, n=3). Le differenze tra le due tesi sono al limite del livello di significatività per  $p < 0,05$  (test U di Mann-Whitney).

Distanza dal punto di semina (metri)	Concentrazione <b>clothianidin</b> nell'aria (ppb) (media $\pm$ errore standard)		Percentuale di abbattimento	p (test U di Mann-Whitney)
	Seminatrice non modificata	Seminatrice modificata		
5	0,2286	0,1388	39,29	<b>0,050</b>
10	0,1714	0,2585	-50,79	0,275

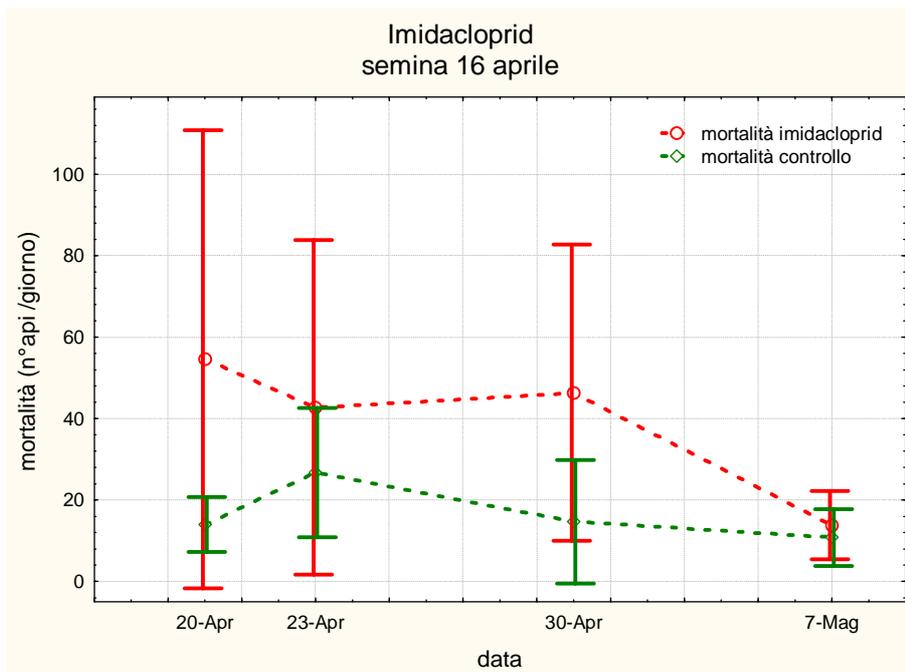
**Tabella 5b** - Confronto nella concentrazione di clothianidin nell'aria tra seminatrice modificata e non modificata (media  $\pm$  errore standard, n=3). La differenza tra le due tesi è al limite del livello di significatività a 5 metri e non significativa a 10 metri per  $p < 0,05$  (test U di Mann-Whitney).

### 2.3 Valutazione degli effetti sulle api delle polveri rilasciate durante la semina

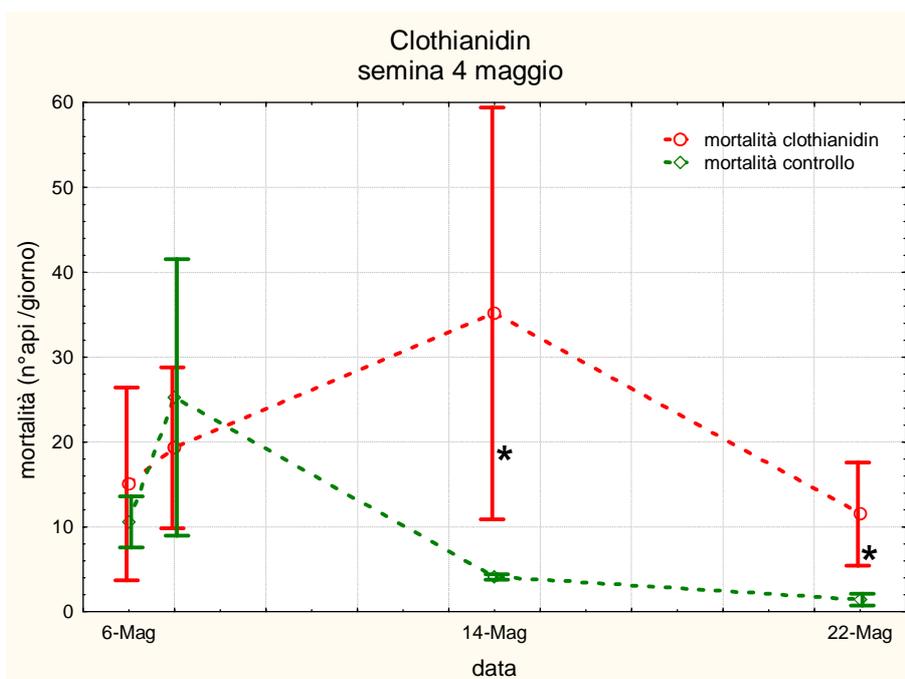
Per valutare gli effetti della dispersione di polveri durante la semina sulle api, sei alveari sono stati posizionati ai margini del campo seminato durante la semina delle tre parcelle (si veda schema in Figura 2) e i parametri di vitalità delle famiglie (mortalità e consistenza numerica) sono stati valutati fino a tre settimane dopo la semina.

Le api morte sono state raccolte in apposite gabbie underbasket, contate e, in caso di mortalità elevata, prelevate per le analisi. Il polline è stato raccolto mediante apposite trappole montate sull'arnia per le successive analisi, che sono tuttavia ancora in corso. Gli alveari di controllo sono stati mantenuti nelle stesse condizioni e nello stesso ambiente, ma a distanza dai campi seminati.

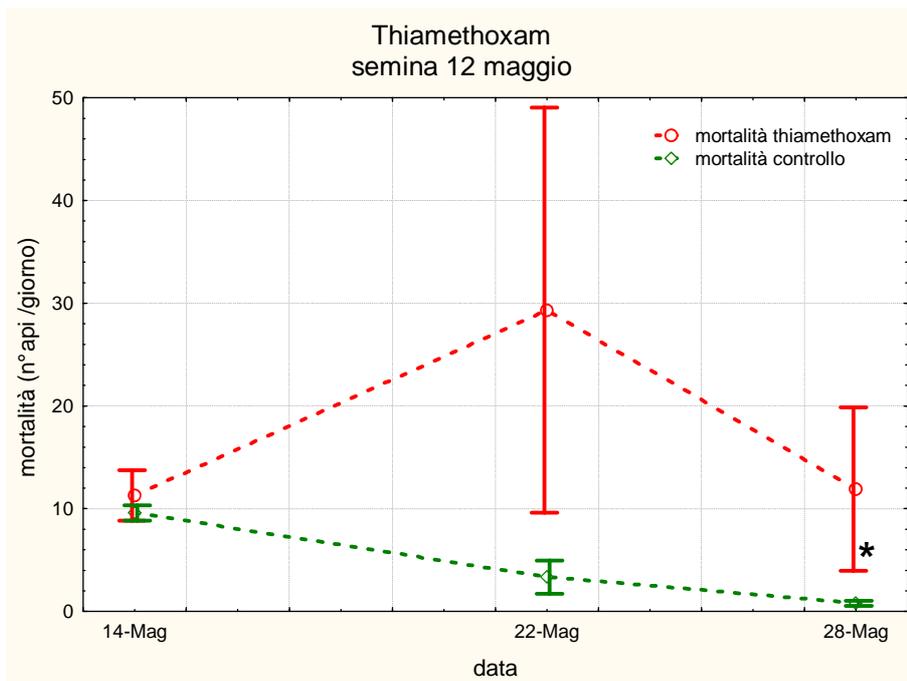
I valori medi di mortalità delle api raccolte nelle gabbie underbasket dopo la semina sono riportati nelle Figure 5, 6, 7 e 8. Le differenze statisticamente significative sono contrassegnate dall'asterisco (test U di Mann-Whitney).



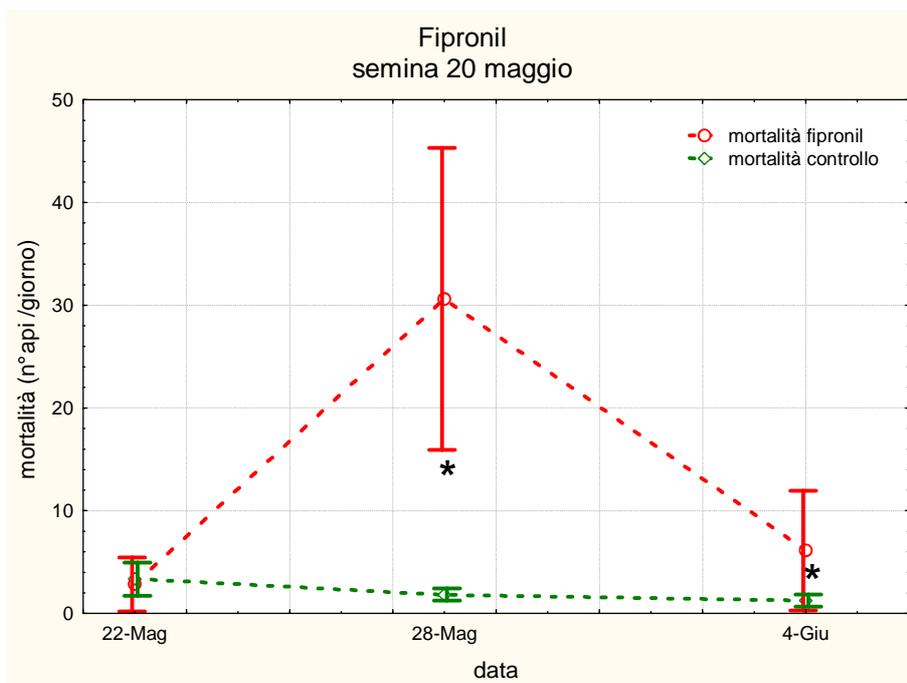
**Figura 5** – Mortalità media ( $\pm$  errore standard) delle api raccolte nelle gabbie underbasket degli alveari esposti alla semina con imidacloprid e di quelli di controllo. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative (test U di Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).



**Figura 6** – Mortalità media ( $\pm$  errore standard) delle api raccolte nelle gabbie underbasket degli alveari esposti alla semina con clothianidin e di quelli di controllo. I valori contrassegnati dall'asterisco indicano differenze statisticamente significative (test U di Mann-Whitney).



**Figura 7** – Mortalità media ( $\pm$  errore standard) delle api raccolte nelle gabbie underbasket degli alveari esposti alla semina con thiamethoxam e di quelli di controllo. I valori contrassegnati dall'asterisco indicano differenze statisticamente significativa (test U di Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).



**Figura 8** – Mortalità media ( $\pm$  errore standard) delle api raccolte nelle gabbie underbasket degli alveari esposti alla semina con fipronil e in quelli di controllo. I valori contrassegnati dall'asterisco indicano differenze statisticamente significative (test U di Mann-Whitney;  $p < 0,05$ ).

Le api morte prelevate in due alveari, 4 giorni dopo la semina con imidacloprid, sono state analizzate ed è stato rilevato un quantitativo di principio attivo pari a 0,04 ng/ape e 0,14 ng/ape. Le api morte prelevate in due alveari il giorno successivo alla semina con clothianidin hanno evidenziato livelli di principio attivo rispettivamente pari a 0,02 ng/ape e 0,07 ng/ape. Le analisi delle api morte prelevate dalle colonie esposte alla semina con thiamethoxam e fipronil sono in corso.

I risultati relativi alla vitalità delle famiglie, valutata in termini di migliaia di api e di celle di covata, prima e dopo la semina, sono riportati nella Tabella 6.

La differenza nel numero di celle di covata tra prima e dopo la semina degli alveari esposti alle polveri di thiamethoxam rispetto al controllo risulta statisticamente significativa (ANOVA per misure ripetute,  $p < 0,05$ ).

	Migliaia di api			Migliaia di celle di covata		
	Prima della semina	7 g dopo la semina	Variazione percentuale	Prima della semina	7 g dopo la semina	Variazione percentuale
<b>Imidacloprid</b>	14,63±0,63	15,33±0,69	+4,78	40,53±3,54	42,00±1,33	+3,63
Controllo	15,94±0,30	16,75±0,31	+5,08	39,20±1,03	41,40±2,45	+5,61
			p=0,276			p=0,961
<b>Clothianidin</b>	19,96±1,43	18,17±1,06	-8,97	42,67±4,10	48,93±3,55	+14,67
Controllo	16,56±0,60	18,56±0,19	+12,08	45,00±2,52	40,00±2,83	-11,11
			p=0,085			p=0,290
<b>Thiamethoxam</b>	16,06±1,84	18,21±1,49	+13,39	33,47±3,09	33,00±3,28	-1,40
Controllo	18,56±0,19	23,13±1,20	+24,62	40,00±2,83	58,00±3,83	+45,00
			p=0,052			p=0,008*
<b>Fipronil</b>	22,46±1,37	22,71±1,39	+1,11	51,47±2,15	56,67±2,17	+10,10
Controllo	23,13±2,15	25,13±2,17	+8,65	58,00±3,83	58,00±1,15	0,00
			p=0,483			p=0,372

**Tabella 6** – Vitalità della famiglia, valutata in termini di migliaia di api e di celle covata, prima della semina e una settimana dopo. Sono indicate media  $\pm$  errore standard ( $n=6$ ) e la variazione percentuale tra prima e dopo la semina. Il dato contrassegnato con asterisco indica un differenza significativa tra trattato e controllo (ANOVA per misure ripetute, valori di  $p$  in tabella).

#### **2.4 Valutazione dell'utilità produttiva ed agronomica della concia dei semi di mais e studio della persistenza nel suolo e della traslocazione nella pianta dei principi attivi usati per la concia**

Le sperimentazioni, in corso presso il CRA - Unità di ricerca per la maiscoltura di Bergamo (CRA-MAC), hanno lo scopo di confrontare la resa produttiva di materiali derivanti da semente trattata con solo fungicida (Celest), rispetto a quella di materiali derivanti dalla stessa semente concia in aggiunta al fungicida anche con i 4 principi attivi sotto studio (imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam e fipronil). A tale scopo, nell'ambito della Rete di Sperimentazione Agronomico-Varietale nell'ambiente italiano, sono state scelte 18 località, distribuite per lo più nelle regioni a vocazione maidicola (Lombardia, Piemonte, Veneto, Friuli, Emilia Romagna) e in Toscana. La distribuzione delle località è riportata in Tabella 7.

In ciascuna località sono state allestite parcelle di 30 mq ciascuna (lunghezza 10-12 m, 4 file) nelle quali è stato seminato un ibrido commerciale di mais (PR31 N27-classe 700) sia conciato con i quattro principi attivi e il fungicida, sia con il solo fungicida (controllo); le 5 tesi sono state replicate 4 volte in ciascuna località.

Sulle colture provenienti da ciascuna tesi, vengono poi effettuati rilievi e valutazioni agronomiche standard, a diversi stadi fenologici, e precisamente:

- umidità della granella (%);
- produzione (q/ha);
- peso ettolitrico;
- altezza pianta;
- altezza spiga;
- percentuale piante spezzate;
- percentuale piante allettate.

<b>Regione</b>	<b>Località</b>
Lombardia	Bergamo
	Sant'Angelo Lodigiano (LO)
	Sesto ed Uniti-fraz.Luignano (CR)
	Caleppio di Settala (MI)
	Castenedolo (BS)
	Brescia
Piemonte	Vigone (TO)
	Chivasso (TO)
	Castelceriolo (AL)
	Vercelli
Veneto	Lonigo (VI)
	Legnago (VR)
	Villadose (RO)
Emilia Romagna	Masi San Giacomo fraz di Masi Torello (FE)
	Parma
Friuli	Mortegliano (UD)
	Palazzolo dello Stella (UD)
Toscana	Marciano della Chiana (AR)

**Tabella 7** – Elenco delle 18 località nelle quali sono state allestite le parcelle sperimentali.

I dati saranno disponibili solo dopo la raccolta, che avverrà presumibilmente entro la fine di ottobre. Inoltre nelle stesse località sono state elaborate, ove possibile, mappe di rischio per la presenza di fitofagi ipogei del mais, grazie alla collaborazione con il DiSTA dell'Università di Bologna, il DIVAPRA dell'Università di Torino e il Dipartimento di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali-Entomologia dell'Università di Padova.

Si sta procedendo infine, con la collaborazione del CRA-PAV di Roma, alla valutazione della persistenza del principio attivo conciante sia nel suolo sia a vari stadi di sviluppo della pianta di mais, attraverso l'analisi dei residui dei quattro principi attivi nei terreni seminati e in diversi tessuti (foglie, radici, fusto, infiorescenze maschile e femminile) e a diversi stadi di sviluppo della pianta, partendo da piante germinate in allevamenti parcellari o in ambiente controllato.

Queste informazioni, relazionate ai risultati delle prove di produttività, potranno fornire indicazioni sull'effettiva necessità e opportunità della concia del seme di mais nelle aree sottoposte ad indagine.

### 3. Effetti della guttazione del mais sulle api

Le piante che sviluppano una pressione radicale mostrano frequentemente la fuoriuscita di liquido dai margini delle foglie, un fenomeno detto guttazione. Le “gocce di rugiada” osservate sulla punta delle foglie delle graminacee al mattino possono essere in realtà delle gocce di guttazione. La guttazione è maggiormente osservabile quando la traspirazione è debole e l’umidità relativa è alta.

Le guttazioni sono presenti al mattino nel periodo primaverile; sono prodotte e permangono nella lamina delle foglie delle piantine di mais anche per parecchie ore, salvo la presenza di vento secco (bora). Nel calice, la guttazione permane anche per tutto il giorno.

#### 3.1 Residui di principio attivo nelle gocce di guttazione di plantule di mais cresciute in vaso

Presso il Dipartimento di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali - Entomologia dell’Università di Padova, sono state fatte analisi sull’eventuale presenza di residui di principio attivo nelle gocce di guttazione fogliare e raccolte al calice, provenienti da plantule di mais seminate in vaso, il cui seme era stato conciato con i 4 principi attivi oggetto della sospensione. I risultati sono mostrati nelle Tabelle 8 e 9.

Concia	Principio attivo	Concentrazione p.a. (mg/L)		
		24 marzo	26 marzo	30 marzo
Gaucht 0,5	imidacloprid	89,16		56,91
Gaucht 1,25	imidacloprid	292,23	345,76	102,91
Poncho	clothianidin	101,72	89,06	76,15
Cruiser	thiamethoxam	16,22	40,85	25,31

**Tabella 8** – Variazione della concentrazione di p.a. nell’acqua di guttazione fogliare di plantule di mais trattate con neonicotinoidi, a diversi giorni dalla semina.

Concia	Principio attivo	Concentrazione p.a. (mg/L)		
		24 marzo	26 marzo	30 marzo
Gaucht 0,5	imidacloprid	134,66		
Gaucht 1,25	imidacloprid	59,17	120,35	8,23
Poncho	clothianidin	46,99	41,50	7,33
Cruiser	thiamethoxam	21,34	25,54	2,93

**Tabella 9** – Variazione della concentrazione di p.a. nell’acqua di guttazione raccolta al calice di plantule di mais trattate con neonicotinoidi, a diversi giorni dalla semina.

La concentrazione di principio attivo nell’acqua di guttazione è risultata molto elevata per le plantule provenienti da seme conciato con i 3 neonicotinoidi imidacloprid, clothianidin e thiamethoxam. Si tratta di concentrazioni ampiamente al di sopra della DL50 di queste molecole e superiori anche alle dosi di utilizzo delle medesime molecole come spray fogliare. Non si è invece rilevata la presenza del principio attivo fipronil.

Le api a cui sono state offerte, con semplici test di laboratorio per ingestione, le guttazioni contenenti i residui dei tre neonicotinoidi sono morte in pochi secondi. Gocce di guttazione provenienti da mais il cui seme era stato conciato con fipronil non hanno invece provocato alcuna mortalità.

I risultati completi delle prove sui residui di principio attivo nelle gocce di guttazione e il loro effetto sulle api sono in stampa sul *Journal of Economic Entomology*.

#### 3.2 Residui di clothianidin nelle gocce di guttazione di plantule di mais cresciute in campo e verifica dell’attività di bottinamento delle api

Presso il Centro Sperimentale Didattico della Facoltà di Agraria dell’Università di Bologna sono state effettuate prove di campo per valutare la presenza di residui nelle gocce di guttazione di

plantule di mais provenienti da seme conciato con clothianidin e l'effettiva possibilità per le api di venire a contatto con tali gocce.

La semina è stata effettuata il 16 aprile e le gocce di guttazione sono state raccolte da diversi punti della plantula di mais in 3 date: 15 maggio, 21 maggio e 4 giugno. I risultati delle analisi delle gocce raccolte il 15 maggio sono illustrati in Tabella 10. I valori rilevati risultano sensibilmente inferiori a quelli ottenuti dalle guttazioni di plantule cresciute in vaso descritte nel precedente paragrafo. Le analisi delle gocce raccolte nelle due date successive e i test di laboratorio sulle api per gli effetti della guttazione sono in corso.

Per la verifica dell'attività di bottinamento delle api sulle gocce di guttazione è stato eseguito il conteggio del numero di api presenti sia sul campo di mais conciato con clothianidin sia in uno non conciato, percorrendo un transetto, costituito da un percorso di tre file da 180 m ognuno, in orari mattutini (dalle 6.30 alle 8.00) e in giorni prestabiliti. I risultati sono mostrati nella Tabella 11. Durante i transetti sono state osservate in totale 3 api nel campo di mais conciato: 1 posata sul terreno, 1 in volo e l'ultima sulle foglie senza prelevare le gocce di guttazione.

Origine delle gocce di guttazione	Residui di clothianidin (mg/L)
Gocce prelevate all'apice delle foglie	0,415
Gocce prelevate sui margini laterali delle foglie	0,086
Gocce emesse dalle foglie in seguito a rottura	0,128

**Tabella 10** – Residui di clothianidin rilevato nelle gocce di guttazioni raccolte in diversi punti della pianta.

Campo	Data rilevamento			
	15 maggio	26 maggio	29 maggio	4 giugno
Mais conciato	1	2	0	0
Mais non conciato	0	0	0	0

**Tabella 11** – Numero di api osservate nel campo di mais conciato e non conciato.

## Parte 4: Effetti letali e subletali sulle api in laboratorio dei principi attivi usati nella concia delle sementi

### 4.1 Effetti subletali: PER test per saggiare la capacità di apprendere e riconoscere gli odori

Il PER test (Proboscis Extension Reflex test) è stato utilizzato per valutare l'impatto di dosi subletali delle molecole utilizzate per la concia delle sementi di mais sull'apprendimento e la memoria degli odori nelle api adulte.

Il test si basa sulla valutazione del comportamento riflesso di estensione della ligula attuato dalle api quando percepiscono stimoli ambientali associati alla presenza di fonti zuccherine. Gli insetticidi neurotossici, che si legano ai recettori del neurotrasmettitore acetilcolina possono influire negativamente sulle aree del cervello deputate all'apprendimento e alla formazione della memoria. Per imidacloprid e fipronil è già stata dimostrata l'effetto di compromissione, rispettivamente, della memoria a medio e a lungo termine.

Le prove fin qui condotte nell'ambito del progetto Apenet hanno riguardato imidacloprid, clothianidin, fipronil e thiamethoxam, e sono state impostate in modo da verificare gli effetti dei principi attivi sia sull'apprendimento che sul riconoscimento degli odori.

Dopo aver isolato api in un contenitore in modo da lasciarle libere di estendere la ligula, ad ognuna di esse è stato somministrato il principio attivo diluito a dosi subletali in 3-5 microlitri di soluzione zuccherina al 40%.

Dopo 30' le api sono poi state addestrate ad estendere la ligula in presenza dell'odore citronello, ricompensato con soluzione zuccherina, e a non estenderla in presenza dell'odore di menta, punito con soluzione salina satura.

A distanza di 60', 180' e 24 h, si è testata la capacità di riconoscere l'odore presentando all'ape sia quello corretto che quello sbagliato (10 volte ciascuno, alternando regolarmente i due odori), verificando la percentuale di risposte corrette (estensione della ligula solo in presenza dell'odore premiato), parzialmente corrette (risponde a entrambi gli odori o a nessuno dei due) e sbagliate (estende la ligula in presenza dell'odore errato e non di quello ricompensato nell'addestramento).

Le dosi subletali ad oggi saggiate per ciascun principio attivo e il confronto con i relativi valori di DL50 sono mostrati in Tabella 12.

Sono stati utilizzati 3 alveari, e ogni principio attivo e dosaggio sono stati somministrati a 10-12 api per ogni alveare, ripetendo la prova per 3 volte per ogni alveare. Per ogni alveare sono state saggiate altrettante api non trattate.

Principio attivo	DL50 48 ore	Dose saggiata
clothianidin	4,7 ng/ape	0,92 ng/ape
imidacloprid	5 ng/ape	0,2 ng/ape
thiamethoxam	1 ng/ape	0,2 ng/ape
fipronil	6 ng/ape	1,2 ng/ape
fipronil	“	0,03 ng/ape

Tabella 12 – Dosi di principio attivo saggiate con il PER test

Per semplicità e sintesi di esposizione vengono qui presentati i dati relativi alla percentuale di risposte corrette, tralasciando le altre categorie di risposta.

L'analisi statistica (ANOVA a due vie, considerando il principio attivo e l'alveare come fattori principali) ha dimostrato che non ci sono differenze significative nel comportamento delle api dei 3 alveari, mentre il principio attivo determina una differenza significativa tra le tesi a confronto (Fig. 9)

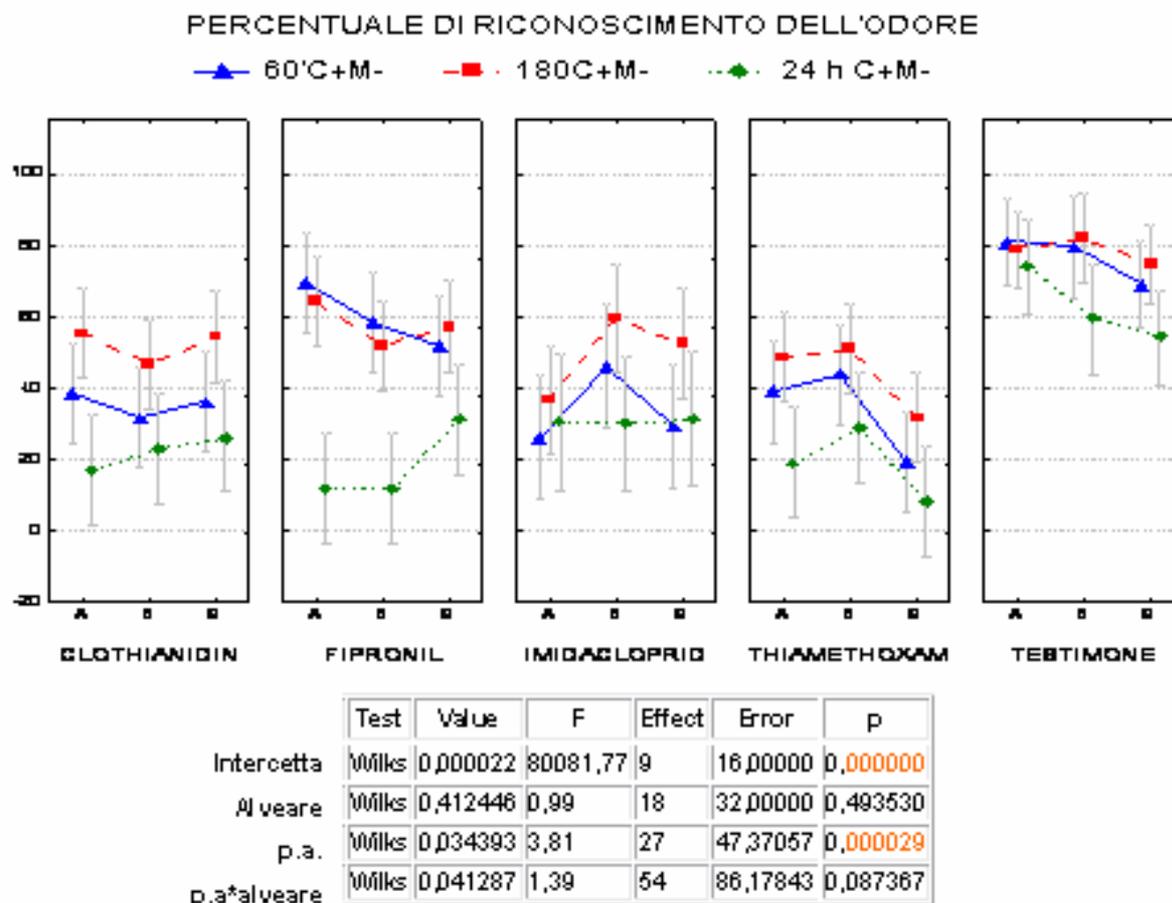


Fig. 9. Interazione tra alveare e principio attivo sulla capacità di rispondere in maniera corretta alla presentazione di un odore (citronello) associato, attraverso un addestramento preliminare, all'ottenimento di una ricompensa zuccherina.

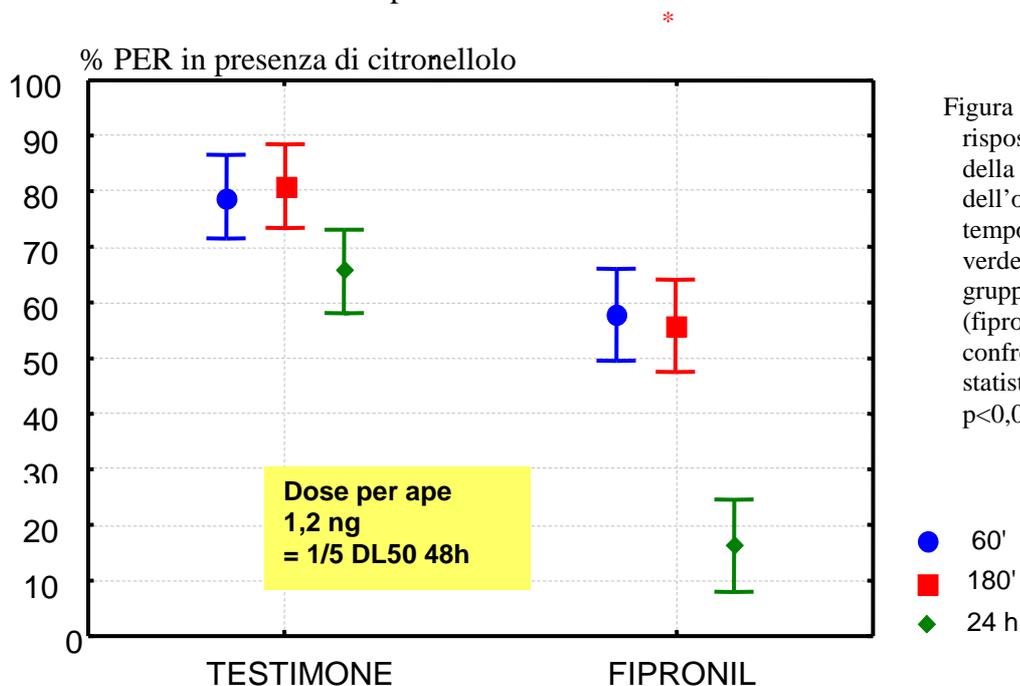


Figura 10 – Percentuale di risposte corrette (estensione della ligula in presenza dell'odore) a diversi intervalli di tempo (60'-blu, 180'-rosso, 24h-verde) dal trattamento per il gruppo testimone ed il trattato (fipronil). Le differenze per il confronto a coppie sono statisticamente significative per  $p < 0,001$

Il confronto tra ciascun principio attivo e il testimone rispetto agli effetti sul comportamento nei diversi intervalli di tempo, (ANOVA a due vie considerando come fattori principali il trattamento e

il tempo) ha dimostrato, per tutti i principi attivi saggiati, una significativa riduzione della capacità di riconoscere l'odore a tutti gli intervalli considerati (Fig. 10, 11, 12, 13)

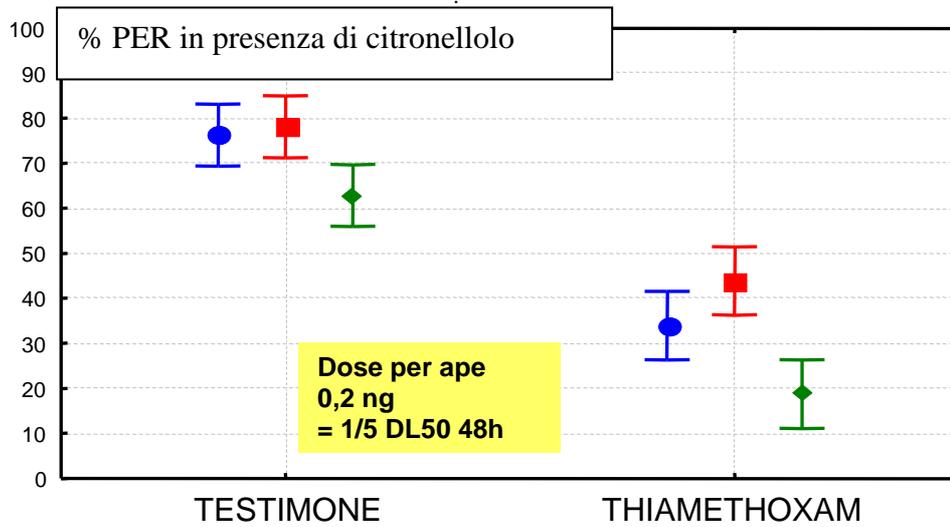
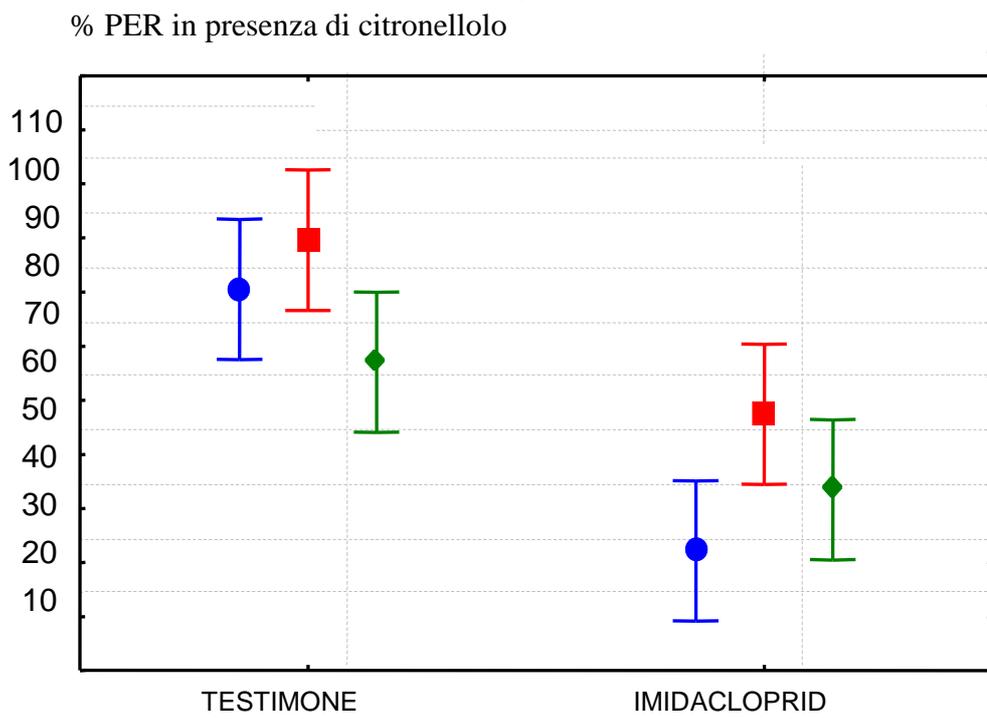


Figura 11 – Percentuale di risposte corrette (estensione della ligula in presenza dell'odore) a diversi intervalli di tempo (60'-blu, 180'-rosso, 24h-verde) dal trattamento per il gruppo testimone ed il trattato (thiamethoxam). Le differenze per il confronto a coppie sono statisticamente significative per  $p < 0,001$

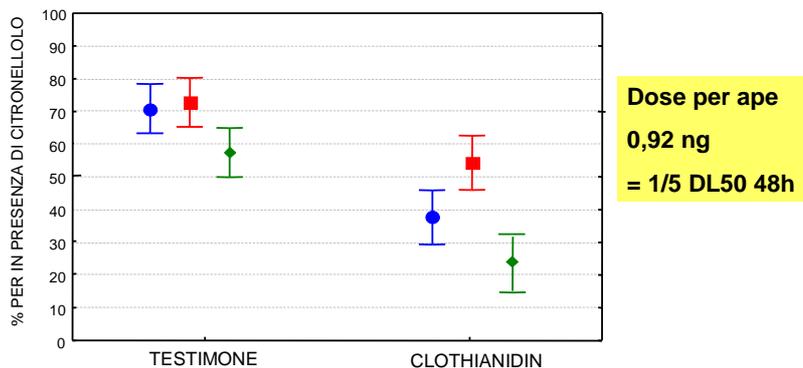
● 60'  
 ■ 180'  
 ◆ 24h



● 60'  
 ■ 180'  
 ◆ 24h

Per Fipronil è stata saggiata anche una dose molto inferiore a quella fissata ad 1/5 della dose subletale (0,03 ng/ape), che ha evidenziato una certa riduzione della capacità di rispondere alla presentazione dell'odore, anche se la grande variabilità tra i dati non ha consentito di evidenziare differenze statisticamente significative (Fig. 14)

	Test	Value	F	DF Effect	DF Error	p
"P.A."	Wilks	0,263523	35,6	4	51	< 0,000001
TEMPO	Wilks	0,380989	7,9	8	102	< 0,000001
"P.A."**TEMPO	Wilks	0,736125	2,1	8	102	0,041332



	P.A.	TEMPO	CLOTHIANIDIN					
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
1	CLOTH	60'		0,064785	0,220756	0,000138	0,000138	0,000248
2	CLOTH	180'	0,064785		0,000187	0,000997	0,000414	0,400089
3	CLOTH	24 h	0,220756	0,000187		0,000138	0,000138	0,000138
4	TEST	60'	0,000138	0,000997	0,000138		0,999230	0,131617
5	TEST	180'	0,000138	0,000414	0,000138	0,999230		0,058004
6	TEST	24 h	0,000248	0,400089	0,000138	0,131617	0,058004	

Fig. 13. Percentuale di risposte corrette (estensione della ligula in presenza dell'odore) a diversi intervalli di tempo (60'-blu, 180'-rosso, 24h-verde) dal trattamento per il gruppo testimone ed il trattato (clothianidin). Le differenze per il confronto a coppie sono statisticamente significative per  $p < 0,001$

Alla 1/20 della DL50 (0,003 ng/ape) fipronil mostra ancora una riduzione della capacità di riconoscere gli odori, anche se a causa della notevole variabilità tra le api testate le differenze non sono statisticamente significative.

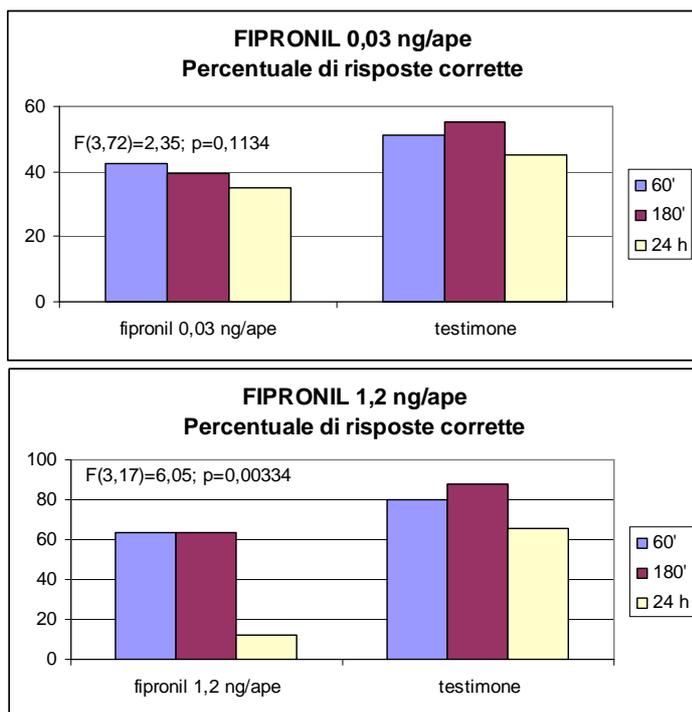


Fig. 14. Capacità di riconoscere l'odore utilizzato per l'addestramento (estensione della ligula solo in presenza dell'odore corretto) a diversi intervalli di tempo (60', 180', 24h).

Dal punto di vista degli effetti subletali, emerge pertanto, che i neonicotinoidi saggiati e il fipronil, somministrati 30 minuti prima della sessione di apprendimento, hanno un forte impatto negativo sulla capacità di riconoscimento degli odori, con una significativa riduzione a tutti gli intervalli saggiati, delle risposte corrette alla presentazione degli odori.

La somministrazione del principio attivo prima dell'addestramento può influire su due fasi del comportamento, che sono l'apprendimento (capacità di formare una associazione tra un odore e l'ottenimento della ricompensa) e la formazione della relativa memoria, processo che richiede diversi passaggi dalla memoria a breve, medio e lungo termine.

Le api trattate con Imidacloprid, Clothianidin e Thiamethoxam hanno condotto l'addestramento tutte in maniera corretta (per tutti i p.a. nel 100% dei casi le api hanno esteso la ligula in presenza dell'odore ricompensato e hanno ricevuto il premio zuccherino, e hanno "assaggiato" anche il sale al sapore di menta, ricevendo la punizione). Nel caso del Fipronil solo il 78% delle api ha condotto l'addestramento in maniera corretta.

E' possibile quindi ipotizzare che Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, e Fipronil non impediscano alle api di formare la memoria relativa agli odori, non avendo interferito con l'addestramento, ma che il loro effetto si eserciti nel momento del recupero della memoria stessa, a intervalli diversi di tempo.

I nostri dati evidenziano un maggiore impatto dei p.a. al test delle 24 ore, dimostrando che l'effetto più significativo si evidenzia per la memoria a lungo termine.

Nel caso dei neonicotinoidi cio conferma solo in parte dati di letteratura relativi a prove condotte con imidacloprid e clothianidin che evidenziavano effetti sul recupero della memoria soprattutto a medio termine.

Riguardo a Fipronil, invece i dati coincidono con quanto emerso da ricerche precedenti, evidenziando una forte riduzione delle risposte corrette dopo 24 ore.

#### ***4.2 Effetti subletali: Test del labirinto per verificare l'impatto sull'orientamento***

Ulteriori studi degli effetti subletali dei principi attivi tramite il PER test e verifiche del loro impatto sull'orientamento spaziale sono stati svolti e sono in corso di elaborazione.

Si evidenzia comunque una riduzione della capacità di orientamento, anche dovuta ad effetti complessivi sulla coordinazione motoria (tremori, movimenti a scatti, rotolamenti), effetti che spesso sono transitori.

Tali effetti motori sono stati oggetto di riprese filmate, e saranno codificati ed analizzati con programmi specifici per l'analisi del comportamento al fine di poterli descrivere e quantificare. I dati sono in corso di elaborazione.

#### ***4.3 Effetti letali***

Poiché le sperimentazioni sono state condotte somministrando 1/5 della DL50<sub>48h</sub> ricavata per ogni p.a. partendo da dati disponibili in letteratura, si è proceduto alla verifica dell'effettiva letalità delle dosi somministrate, secondo il protocollo previsto per i test EPPO, nei quali la dose viene somministrata a gruppi di 10 api in 200 microlitri.

E' stata inoltre condotta una prova per verificare la letalità della stessa quantità di principio attivo somministrata secondo le modalità utilizzate per la prova PER e per il labirinto, in cui il p.a. viene diluito in 3-5 microlitri (a seconda del p.a.), che vengono poi offerti all'ape.

Le prove sono ancora in corso, e sono state completate per ora per Imidacloprid

La prova è stata condotta su 3 alveari, ripetendola 3 volte.

I dati fin qui raccolti dimostrano che le dosi teoricamente subletali da noi utilizzate provocano una significativa mortalità nelle api, con un'interazione significativa a seconda dell'alveare.

In aggiunta a ciò, la mortalità registrata per la somministrazione più concentrata (3-5 microlitri) rispetto a quella più diluita (20 microlitri) evidenzia una maggiore tossicità della prima rispetto alla seconda (Fig. 15)

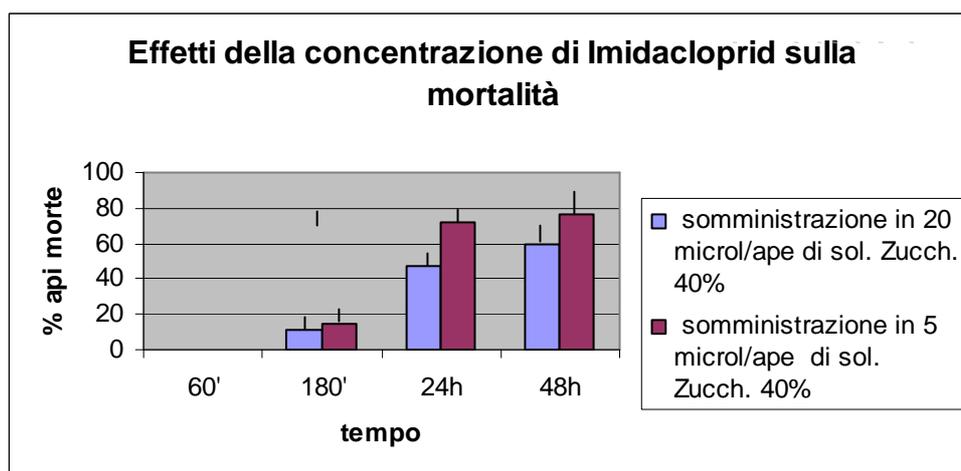


Fig. 15 Mortalità rilevata a intervalli crescenti di tempo.

#### 4.4 Effetti sulla covata

È stato applicato il protocollo messo a punto da Aupinel *et al.* presso INRA (Francia), che permette di allevare le larve di api in vitro senza l'ausilio delle api nutrici e di verificare la loro risposta a diversi fattori di stress.

La tossicità (espressa come  $DL_{50}$  a 48h) delle molecole in questione sulle larve è stata valutata attraverso la somministrazione di 5 dosi crescenti di principio attivo ad un campione di 48 larve più il testimone. I primi risultati sono illustrati nella Tabella 13.

Sulla base dei risultati relativi alle prime due sostanze saggiate, clothianidin e fipronil, si deduce che la covata sia notevolmente meno suscettibile all'intossicazione rispetto alle api adulte. Per il clothianidin non è stato possibile calcolare la  $DL_{50}$  larvale, in quanto la massima dose somministrabile (in base alla solubilità del principio attivo), pari a 3000 ng/larva, ha prodotto una mortalità corretta dell'11,4%. Le prove di tossicità larvale per gli altri due principi attivi (imidacloprid e thiamethoxam) sono in corso.

Principio attivo	$DL_{50}$ (24h) api adulte	$DL_{50}$ (48h) larvale
clothianidin	4 ng/ape	>>3000 ng/larva
fipronil	4 ng/ape	39 ng/larva

**Tabella 13** – Confronto tra la  $DL_{50}$  larvale e quella degli adulti a 48 ore di clothianidin e fipronil (dato ricavato dalla letteratura).

## 5. Conclusioni

I dati ottenuti dalle sperimentazioni fin qui condotte, seppure incompleti in alcune parti e con necessità di ripetizione per altre, ci consentono di trarre alcune parziali conclusioni.

La rete di monitoraggio Apenet, attivata in tutto il territorio italiano, non ha rilevato per questo inizio di anno, casi di morie o spopolamenti connessi con la semina mais. In nessuna delle stazioni di monitoraggio si sono verificati fenomeni rilevanti, fatta eccezione per gli apiari situati nell'area della piana di Sibari, dove si è verificato un esteso avvelenamento, dovuto però all'utilizzo in fioritura di neonicotinoidi in formulazione spray (Actara, p.a. thiamethoxam).

Il sistema delle segnalazioni, che nella primavera passata aveva raccolto 185 casi di morie nel periodo della semina del mais, di cui 132 con campioni trovati positivi ai principi attivi usati nella concia, in questo primo semestre ha raccolto in totale 10 segnalazioni, di cui solo tre relative al periodo della semina del mais e i cui campioni hanno rivelato l'utilizzo illecito dei prodotti per la concia interessati dalla sospensione. Delle altre 7 segnalazioni, 5 sono risultate essere causate da neonicotinoidi in formulazione spray, mentre per le altre 2 le analisi non hanno rilevato la presenza di residui.

La sperimentazione riguardante la semina di mais conciato con i 4 principi attivi in esame ha portato i seguenti risultati:

- la polverosità della semente concia è risultata al disotto del limite stabilito di 3g/q;
- il rilascio di polveri in campo durante la semina con seminatrice pneumatica è variato tra 0,5 e 3,5 microgrammi/cm<sup>2</sup> con la seminatrice modificata, e tra 1 e 5 microgrammi/cm<sup>2</sup> con quella non modificata, con una significativa diminuzione all'aumentare della distanza dalla zona di semina;
- la concentrazione delle polveri rilasciate nell'aria durante la semina è risultato variabile tra 0,1 e 0,8 ppb, con un aumento all'aumentare della distanza da 5 a 10 m nelle prove con seminatrice modificata, e invece una diminuzione in quelle con seminatrice non modificata;
- dai dati in nostro possesso sembra che l'applicazione del sistema di abbattimento della polverosità "dual pipe deflector", pur permettendo una riduzione molto variabile nell'emissione delle polveri a terra, contribuisce alla maggior dispersione delle stesse nell'aria, portandole a maggiori distanze e quindi aumentando la probabilità di contatto con le api in volo e agli alveari presenti nella campagna circostante.

Le colonie direttamente esposte alla semina con i quattro principi attivi e la seminatrice dotata di deflettori hanno evidenziato, in alcune giornate, dati di mortalità delle api adulte più elevati di quelli degli alveari testimone. Non si sono riscontrati fenomeni di spopolamento. Dalle analisi fin qui condotte (per due soli principi attivi) le concentrazioni di principio attivo riscontrate nelle api morte risultano comunque al di sotto della soglia letale. La vitalità e lo sviluppo delle colonie è risultato, nella semina con thiamethoxam, inferiore negli alveari esposti alla semina rispetto a quelli testimone.

La concentrazione di principio attivo nelle gocce di guttazione è risultata molto variabile, in base allo stadio fenologico della pianta e alla modalità di propagazione (in vaso o in campo) evidenziando in ogni caso valori di molto superiori o vicini alla soglia di tossicità per le api. Dalle prime osservazioni in campo non è stato possibile dimostrare un'attività di bottinamento delle api sulle gocce.

I primi risultati dei test per gli effetti subletali nei confronti delle api adulte hanno rivelato una compromissione del recupero della memoria rispettivamente a medio e lungo termine. Tali effetti si sono manifestati a dosi molto inferiori (circa 1/5) della DL<sub>50</sub> riportata in letteratura.

I risultati dei primi test di tossicità sulla covata indicano una sensibilità delle larve ai principi attivi fin ora saggiati (clothianidin e fipronil) sensibilmente inferiore rispetto a quella degli adulti. Ciò risulta in linea con la tipologia di danno che viene segnalata nei casi di avvelenamento durante la semina con seme conciato, che consiste principalmente nella perdita di api adulte. Gli eventuali danni sulla covata sono solitamente indiretti, conseguenti all'assenza delle api nutrici.

In conclusione, da questi primi parziali risultati, sono emersi alcuni elementi comprovanti una certa tossicità dei principi attivi usati nella concia del seme di mais nei confronti delle api. Sebbene il miglioramento del processo di concia abbia assicurato una minore polverosità del seme, alcuni danni agli alveari sono stati ancora rilevati nel corso delle semine sperimentali.

Inoltre le quantità di principio attivo rilasciate in campo durante la semina, sebbene al di sotto della soglia letale per le api, sono vicine, come ordine di grandezza, a quelle in grado di provocare, sulla base dei primi risultati di laboratorio, un danno ai processi d'apprendimento e memoria delle api adulte.

Occorre infine sottolineare che le condizioni climatiche di questa primavera, caratterizzata da elevata piovosità, non hanno favorito la dispersione di polveri nell'ambiente. Poiché si ritiene che i fattori climatici abbiano una grande influenza nel determinare l'impatto delle semine con mais conciato sulle api (anche negli anni passati il fenomeno è risultato molto variabile da un anno all'altro), si ritiene necessario replicare le sperimentazioni in almeno una successiva stagione ed in diverse località - differenti per caratteristiche pedoclimatiche - al fine di poter acquisire dati più certi.

Si ritiene altresì opportuno, prima di trarre conclusioni definitive, attendere anche gli ultimi risultati dei test di laboratorio, sia letali sia subletali, che prevedono, oltre al completamento dei test con i principi attivi mancanti, anche una loro ripetizione con l'utilizzo delle polveri ottenute dal seme conciato per mezzo del cilindro di Heubach al posto del principio attivo puro, simulando così una situazione molto più vicina alla reale esposizione in campo.

## **Responsabili delle ricerche descritti nei singoli capitoli**

### **1. La rete di monitoraggio**

*Responsabile di scheda di ricerca*

Dr Franco Mutinelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie



*Collaboratori*

Dr Claudio Porrini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

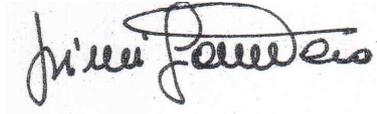


## 2. Dispersione di polveri durante la semina del mais conciato

*Responsabile di scheda di ricerca*

Ing. Giovanni Santoro

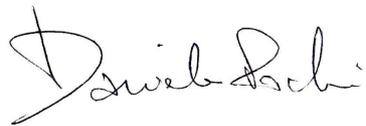
Direttore CRA - Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria



*Sperimentatori*

Dr Daniele Pochi

CRA - Unità di Ricerca per l'Ingegneria Agraria



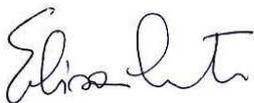
Dr Enzo Marinelli

CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



Dr.ssa Elisa Conte

CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



Dr Patrizio Pulcini

CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale



*Collaboratori*

Dr Mario Motto

Direttore CRA - Unità di ricerca per la maiscoltura



### **3. Effetti della guttazione del mais sulle api**

#### ***3.1 Residui di principio attivo nelle gocce di guttazione di plantule di mais cresciute in vaso***

*Responsabile di scheda di ricerca*

Dr.ssa Laura Bortolotti

CRA - Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura



*Collaboratori*

Prof. Vincenzo Girolami

Dipartimento di Agronomia Ambientale e produzioni vegetali – Entomologia, Università di Padova



#### ***3.2 Residui di clothianidin nelle gocce di guttazione di plantule di mais cresciute in campo e verifica dell'attività di bottinamento delle api***

*Responsabile di scheda di ricerca*

Prof. Stefano Maini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



*Sperimentatori*

Dr Claudio Porrini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



Dr Fabio Sgolastra

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



#### **4. Effetti letali e subletali sulle api in laboratorio dei principi attivi usati nella concia delle sementi**

##### ***4.1 Test per gli effetti subletali***

*Responsabile di scheda di ricerca*

Prof. Stefano Maini

Dip. Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna



*Collaboratori*

Dr.ssa Bettina Maccagnani

Centro Agricoltura Ambiente "Giorgio Nicoli", Bologna



##### ***4.2 Effetti sulla covata***

*Responsabile di scheda di ricerca*

Dr.ssa Laura Bortolotti

CRA - Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura



*Sperimentatori*

Piotr Medrzycki

CRA - Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura

